

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-321498

(43)Date of publication of application : 11.11.2003

(51)Int.Cl.

C07K 16/18
C12N 5/10
C12N 15/02
C12P 21/08
G01N 33/53
G01N 33/577

(21)Application number : 2002-129003

(71)Applicant : OBIHIRO UNIV OF AGRICULTURE & VETERINARY
MEDICINE
FUJIREBIO INC

(22)Date of filing : 30.04.2002

(72)Inventor : SHINAGAWA SHINICHI
HORIUCHI MOTOHIRO
UMETANI ATSUSHI

(54) ANTI-ABNORMAL PRION PROTEIN MONOCLONAL ANTIBODY AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME AND METHOD FOR IMMUNOASSAY OF ABNORMAL PRION PROTEIN THEREWITH

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a monoclonal antibody for recognizing only an abnormal prion protein.

SOLUTION: An anti-abnormal prion monoclonal antibody or its antigen-binding fragment which reacts with the abnormal prion protein as the corresponding antigen and does substantially not react with a normal prion protein is provided. Thereby, the anti-abnormal prion monoclonal antibody or its antigen-binding fragment which reacts with the abnormal prion protein as the corresponding antigen and does substantially not react with the normal prion protein is provided for the first time. Since the monoclonal antibody reacts with the natural abnormal prion protein as the corresponding antigen, the assay of the abnormal prion protein can highly sensitively be assayed.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

28.04.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-321498

(P2003-321498A)

(43)公開日 平成15年11月11日(2003.11.11)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード*(参考)
C 0 7 K 16/18		C 0 7 K 16/18	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10		C 1 2 P 21/08	4 B 0 6 4
15/02		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08		33/577	B 4 H 0 4 5
G 0 1 N 33/53		C 1 2 N 5/00	B
審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 8 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2002-129003(P2002-129003)

(22)出願日 平成14年4月30日(2002.4.30)

特許法第30条第1項適用申請有り 2001年10月31日 発行の「第49回ウイルス学会学術集会・総会 プログラム・抄録集」に発表

(71)出願人 502073614

帯広畜産大学長

北海道帯広市稲田町西二線十三番地

(71)出願人 000237204

富士レビオ株式会社

東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号

(72)発明者 品川 森一

北海道帯広市南町東2条3丁目57-1

(72)発明者 堀内 基広

北海道帯広市西11条南40丁目5番7号

(74)代理人 100088546

弁理士 谷川 英次郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗異常型プリオンモノクローナル抗体及びその製造方法並びにそれを用いた異常型プリオンタンパク質の免疫測定方法

(57)【要約】

【課題】 異常型プリオンタンパク質のみを認識するモノクローナル抗体を提供すること。

【解決手段】 異常型プリオンタンパク質を対応抗原とし、正常型プリオンタンパク質とは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を提供した。

【効果】 異常型プリオンタンパク質を対応抗原とし、正常型プリオンタンパク質とは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体が初めて提供された。本発明のモノクローナル抗体は、天然の異常型プリオンタンパク質を対応抗原としているので、異常型プリオンタンパク質の測定を高感度に行うことができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 異常型プリオンタンパク質を対応抗原とし、正常型プリオンタンパク質とは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項2】 未変性の異常型プリオンタンパク質を対応抗原とする請求項1記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項3】 終濃度80 μg/mlのプロテイナーゼKで処理した異常型プリオンタンパク質と抗原抗体反応する請求項1又は2記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項4】 終濃度80 μg/mlのプロテイナーゼKで処理した異常型プリオンタンパク質と抗原抗体反応するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項5】 終濃度3Mの塩酸グアニジン処理により変性された異常型プリオンタンパク質と抗原抗体反応しない請求項4記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項6】 ハイブリドーマ6H10(FERM P-18821)により産生されるモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項7】 モノクローナル抗体である請求項1ないし6のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片。

【請求項8】 請求項1ないし7のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項9】 ハイブリドーマ6H10(FERM P-18821)である請求項8記載のハイブリドーマ。

【請求項10】 請求項1ないし7のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片と異常型プリオンとの抗原抗体反応を利用した免疫測定により異常型プリオンを測定する方法。

【請求項11】 請求項1ないし7のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を含む、請求項9記載の方法を行うための免疫測定用キット。

【請求項12】 異常型プリオンタンパク質を動物に免疫し、免疫した動物の抗体産生細胞由来のハイブリドーマを作製し、未変性の異常型プリオンタンパク質と反応するが、正常型プリオンタンパク質とは反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、スクリーニングにより選択されたハイブリドーマから前記抗異常型プリオンモノクローナル抗体を回収することを含む請求項1ないし7のいずれか1項に記載の抗異常型プリオンモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項13】 免疫する前記異常型プリオンタンパク質は、脳組織から分別遠心法により分離されたものである請求項12記載の方法。

【請求項14】 前記動物は、プリオン遺伝子欠損動物である請求項12又は13記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗異常型プリオンモノクローナル抗体及びその製造方法並びにそれを用いた異常型プリオンタンパク質の免疫測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】クロイツフェルト・ヤコブ病（以下、CJDと略）、ヒツジにおけるスクレービー病、伝染性ミンク脳症をはじめとする脳神経系疾患は、長期間の潜伏期間を経た後に発症し、ほぼ神経系に局限した脳組織の海綿状変性およびアミロイド斑（クールー斑）を主徴とする疾患であり、進行性に増悪して死に至る。発症原因は未だ不明な点も多いものの、ウイルスなどの感染性病原体の関与ではなく、異常型プリオンタンパク質の沈着に起因するとの考え、いわゆる「プリオン仮説」が主流である。この疾患は脳薄切標本の病理学的手法により診断されている。

【0003】この疾患の起因源は感染性を有するとされ、脳神経組織の摂食（クールー病など）、電極あるいは脳硬膜移植などの医療行為による感染も報告されている。最近では、ウシ海綿状脳症ならびに新型CJDが経口感染により伝播すると考えられている。

【0004】正常型プリオンタンパク質は細胞膜に存在する糖蛋白質であり、真核細胞である酵母をはじめとして広く存在している。また、正常型プリオンタンパク質をコードする遺伝子は単一遺伝子であり、コードされるアミノ酸配列は哺乳類の間では非常によく保存されており、特にヒト、ヒツジ、ウシの間の相同性は約90%以上と報告されている。

【0005】正常型プリオンタンパク質の機能については未だ不明といわざるを得ないが、アミノ酸配列が保存されていることから神経組織の発生分化および機能に重要な役割を担っているであろうと推測される。また、最近のプリオンタンパク質（PrP）遺伝子欠損マウスでの検討からは、加齢に伴う下半身の振戦などの歩行異常、病理学的には小脳の萎縮、特に小脳プルキンエ細胞の脱落などが観察されている。

【0006】一般にプリオン病を発症する個体と正常個体間のプリオンタンパク質のアミノ酸配列に差異は認められないと言われている。このため、異常型プリオンタンパク質の沈着は、アミノ酸配列ではなく立体構造の異なることに起因すると考えられている。このため、従来の手技により作製された抗体のうち、アミノ酸の一次配列を認識する抗体では両者を区別することはできない。また、アミノ酸配列が動物間で非常によく保存されているために抗原性の弱いことも推測される。このため、立体構造を維持したままの免疫原であるとともに、抗原性を高めた抗原の作製もしくは抗原性を認識する免疫動物

の作製が望まれる。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、異常型プリオンタンパク質のみを認識するモノクローナル抗体及びその製造方法を提供することである。また、本発明の目的は、該モノクローナル抗体を用いて異常型プリオンタンパク質を免疫測定する方法を提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】異常型プリオンタンパク質のみを認識するモノクローナル抗体を作製しようとするのであれば、異常型プリオンタンパク質を免疫原として用いて動物を免疫し、常法によりモノクローナル抗体を得、異常型プリオンタンパク質と反応するが正常型プリオンタンパク質とは反応しないモノクローナル抗体をスクリーニングすることが考えられる。しかしながら、プリオンタンパク質は異常型と正常型でアミノ酸配列に差がないばかりではなく、種特異性も少ないので一般的に抗体ができづらいタンパク質であり、その上異常型と正常型の差を認識するような抗体は更にできづらい。

【0009】本願発明者らは、鋭意研究の結果、異常型プリオンタンパク質の立体構造をなるべく保持したまま精製した異常型プリオンタンパク質を免疫原とし、PrP^{Sc}遺伝子欠損マウスに免疫することにより、異常型プリオンタンパク質のみを認識するモノクローナル抗体を作製することに成功し、本発明を完成した。

【0010】すなわち、本発明は、異常型プリオンタンパク質を対応抗原とし、正常型プリオンタンパク質とは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を提供する。また、本発明は、終濃度80 µg/mlのプロテイナーゼKで処理した異常型プリオンタンパク質と抗原抗体反応するモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を提供する。また、本発明は、ハイブリドーマ6H10(FERM P-18821)により産生されるモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を提供する。さらに、本発明は、上記本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを提供する。さらに、本発明は、上記本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片と異常型プリオンとの抗原抗体反応を利用した免疫測定により異常型プリオンを測定する方法を提供する。さらに、本発明は、上記本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を含む、請求項9記載の方法を行うための免疫測定用キットを提供する。さらに、本発明は、異常型プリオンタンパク質を動物に免疫し、免疫した動物の抗体産生細胞由来のハイブリドーマを作製し、未変性の異常型プリオンタンパク質と反応するが、正常型プリオンタンパク質とは反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、スクリーニングにより選択されたハイブリドーマから前記抗異常型プリオンモノクロー

ナル抗体を回収することを含む上記本発明の抗異常型プリオンモノクローナル抗体の製造方法を提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】本発明のモノクローナル抗体は、異常型プリオンタンパク質を対応抗原とし、正常型プリオンタンパク質とは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体である。ここで、「対応抗原とし」とは、異常型プリオンタンパク質を免疫原として用いた動物に由来するという意味である。もっとも、異常型プリオンタンパク質を対応抗原とするモノクローナル抗体と同一のモノクローナル抗体であれば、他の方法、例えば、遺伝子工学的手法により生産されるモノクローナル抗体も本願発明のモノクローナル抗体に該当する。また、「実質的に反応しない」とは、正常型プリオンに対する反応性が、異常型プリオンに対する反応性よりも識別可能な程度に低いことを意味する。従って、正常型プリオンに対して交差反応性を有する場合であっても、その免疫学的反応性が、異常型プリオンに対する免疫学的反応性よりも識別可能な程度に低い場合には、本明細書で言う「正常型プリオンとは実質的に反応しない」場合に含まれ、本発明の範囲に含まれる。言うまでもなく、正常型プリオンと交差反応性を有さないモノクローナル抗体、すなわち、異常型プリオンと反応するが、正常型プリオンとは反応しないモノクローナル抗体が好ましい。

【0012】本発明のモノクローナル抗体は、未変性、すなわち、グアニジン塩酸塩や尿素等のタンパク変性剤で変性していない異常型プリオンタンパク質を対応抗原とするものが好ましい。また、グアニジン塩酸塩等の変性剤で可溶化した異常型プリオンタンパク質とは反応しないモノクローナル抗体であることが好ましい。さらに、終濃度80 µg/mlのプロテイナーゼKで処理した異常型プリオンタンパク質と抗原抗体反応するモノクローナル抗体であることが好ましい。このようなモノクローナル抗体は、異常型プリオンタンパク質に固有の立体構造を認識するものであり、異常型と正常型の識別を明確に行うことができる。このような抗異常型プリオンモノクローナル抗体の具体例として、下記実施例において作製した、ハイブリドーマ6H10により産生されるモノクローナル抗体を挙げることができる。なお、ハイブリドーマ6H10は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-18821の受託番号で寄託されている。

【0013】本発明は、また、上記本発明のモノクローナル抗体の抗原結合性断片をも提供する。ここで、「抗原結合性断片」とは、抗体のFabフラグメントやF(ab')₂フラグメントのような、当該抗体の抗原結合性を発揮する断片を意味する。これらの断片は、常法に基づき、本発明のモノクローナル抗体をパバインやペプシン等のタンパク質分解酵素で分解することにより容易に得ること

ができる。このような抗原結合性断片も、後述する免疫測定に本発明のモノクローナル抗体と同様に用いることができる。

【0014】上記の通り、異常型プリオンタンパク質を免疫原として用いて、異常型プリオンタンパク質と反応するが、リコンビナントプリオンタンパク質とは反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体を作製することは困難である。この問題を解決するために、本願発明者らは、異常型プリオンタンパク質の立体構造をなるべく保持したまま異常型プリオン感染マウス脳より分離した異常型マウスプリオンタンパク質を同種のPrP遺伝子欠損マウスに免疫することにより、異常型プリオンタンパク質と特異的に反応するモノクローナル抗体を得た。ここで、免疫原として用いる異常型プリオンタンパク質は、異常型プリオン感染動物の脳から分別遠心法等の物理的な分離方法により分離されたものであることが好ましい。分別遠心法の好ましい具体的な条件は、下記実施例に詳述されている。変性剤処理等の化学的な処理をできるだけ用いることなく免疫原を精製することにより、本発明のモノクローナル抗体が得やすくなる。

【0015】上記した免疫原および免疫動物を用いること以外は、常法により本発明のモノクローナル抗体を作製することができる。すなわち、上記免疫原を動物に免疫し、免疫した動物の抗体産生細胞由来のハイブリドーマを作製し、異常型プリオンタンパク質と反応するが、リコンビナントプリオンタンパク質とは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングし、スクリーニングにより選択されたハイブリドーマから前記抗異常型プリオンモノクローナル抗体を回収することにより行うことができる。脾細胞やリンパ球のような抗体産生細胞と、ミエローマ細胞のような不死化細胞とのハイブリドーマを作製する方法はこの分野において周知である。

【0016】本発明のモノクローナル抗体と異常型プリオンとの抗原抗体反応を利用した免疫測定により異常型プリオンを測定することができる。なお、ここで、「測定」には検出及び定量測定の両者が包含される。免疫測定方法自体はこの分野において周知であり、周知のいずれの方法も本発明の範囲に含まれる。すなわち、反応形式に基づき分類すると、サンドイッチ法、競合法、凝集法等があり、標識に基づき分類すると、酵素免疫分析、放射免疫分析、蛍光免疫分析等があるがこれらのいずれもが本発明で言う「免疫測定」に包含される。さらに、免疫組織染色や、ウェスタンブロット等も本発明で言う「免疫測定」に包含される。

【0017】なお、これらの免疫測定法自体は周知であり、本明細書で説明する必要はないが、簡単に記載すると、例えば、サンドイッチ法では、本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を第1抗体として固相に不動化し、検体と反応させ、洗浄後、異常型プリオン

と抗原抗体反応する第2抗体（正常型プリオンとも抗原抗体反応する抗体でもよいし、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい）を反応させ、洗浄後、固相に結合した第2抗体を測定する。第2抗体を酵素、蛍光物質、放射性物質、ビオチン等で標識しておくことにより固相に結合した第2抗体を測定することができる。濃度既知の複数の標準試料中について上記方法により測定し、測定された標識量と標準試料中の異常型プリオン量の関係に基づき検量線を作成し、未知濃度の被検試料についての測定結果をこの検量線に当てはめることにより、被検試料中の異常型プリオンを定量することができる。なお、第1抗体と第2抗体を上記の説明と入れ替えてもよい。また、凝集法では、ラテックス等の粒子に本発明のモノクローナル抗体又はその抗原結合性断片を不動化し、検体と反応させて吸光度を測定する。濃度既知の複数の標準試料中について上記方法により測定し、測定された標識量と標準試料中の異常型プリオン量の関係に基づき検量線を作成し、未知濃度の被検試料についての測定結果をこの検量線に当てはめることにより、被検試料中の異常型プリオンを定量することができる。

【0018】また、各免疫測定に必要な試薬類も周知であり、モノクローナル抗体に特徴があること以外は、通常の免疫測定キットを用いて免疫測定を行うことができる。例えば、通常、緩衝液、固相、標識第2抗体等が含まれる。

【0019】

【実施例】以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0020】(1) 免疫原の作製

プリオン感染マウス脳から分別遠心法により精製したマウス異常型プリオンタンパク質(PrP^{Sc})を免疫原として使用した。マウス異常型プリオンタンパク質の精製は、次の通りであった。

【0021】1) 感染脳組織を採取し、適当な大きさに細断する。

2) PBSにて2度洗浄を行う。

3) ホモジネートバッファーを加えホモジナイズする（脳組織/ホモジネートバッファー=1:9;10%脳乳剤）。

4) 15,000rpm,30分、4℃で遠心分離し、上清を採取する。

5) 更に、45,000rpm,3時間、4℃超遠心分離し沈殿を採取する。

6) 上記沈殿にバッファーBを加え、ホモジナイズする。

7) 45,000rpm,3時間、4℃超遠心分離し沈殿を採取する。

8) 上記沈殿にバッファーCを加えホモジナイズする。

9) 上記溶液に最終濃度100μg/mlになるようにRNase A

を加え30分間室温にて反応を行った後、4°Cに移し1晩反応を継続させる。

10) 上記サンプルを1M ショ糖クッションの上に重層し、45,000rpm, 2時間、20°Cで超遠心分離し、沈殿を採取する。

11) 上記沈殿を0.1% ZWITTERGENT(CALBIOCHEM社製両イオン性界面活性剤)-PBSにサスペンドする。

12) 上記溶液をホモジナイズする。

13) 上記溶液を25,000rpm, 20分、4°Cで超遠心分離し沈殿を回収する。

14) 沈殿を0.1% ZWITTERGENT-PBSにサスペンドし免疫源とする。

【0022】使用バッファー

1) ホモジネートバッファー: 10% ギャラクシール(Sarkosyl 1), 10mM Tris-HCl, 133mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, pH 8.3

2) バッファーB: 10mM Tris-HCl, 1.71M NaCl, 1mM EDTA, 1% ギャラクシール, 1mM DTT, pH8.3

3) バッファーC: 10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, pH7.4

4) ショ糖クッション: 1M ショ糖, 100mM NaCl, 0.5% ZWITTERGENT, 10mM PB, pH6.9

【0023】(2) 免疫および細胞融合

(1)で得られた精製マウスPrPSc(濃度1.0 μg/ml)を等量のプロイオン完全アジュバントと混和し、PrP遺伝子欠損マウス(Yokoyama et al., Journal of Biological Chemistry, vol. 276, 11265-11271, 2001)に0.2 μg/mlづつ頸部皮下に接種した。免疫は2週間ごとに計3回行った。最終免疫3日後に脾臓を摘出し、細胞を分散させた後に、ポリエチレングリコール法によりP3U1ミエロマ細胞との細胞融合を行った。

【0024】HAT培地中での培養によりハイブリドーマを選択した後、抗体産生細胞のスクリーニングは、上記精製マウスPrPSc抗原を使用してELISA法で行った。すなわち、細胞培養上清を採取し、(1)で得られた精製マウスPrPSc抗原を固定したELISAプレート(96 well-type)に分注して反応させた後に洗浄、さらに西洋わさびペルオキシダーゼ酵素(HRP)標識抗マウスIg(IgG+IgM)を反応させ、発色反応で抗体産生細胞の有無を確認した。さらに、公知のリコンビナント正常型プリオン(Simone Hornemann et al., "Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization", Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters 413 (1997) 277-281)を抗原として同様にELISAを行い、リコンビナント正常型プリオンと抗原抗体反応しないモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選択した。

【0025】その結果、抗異常型プリオンタンパク質モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマとして、6H10、31C6、72-5及び44B1が得られた。さらに、これらの

うち、31C6、72-5及び44B1が産生するモノクローナル抗体はリコンビナント正常型プリオンと抗原抗体反応したが、6H10が産生するモノクローナル抗体はリコンビナント正常型プリオンとは抗原抗体反応しなかった。従って、6H10が産生するモノクローナル抗体(mAb 6H10)が、本発明のモノクローナル抗体である。上記の通り、ハイブリドーマ6H10は独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-18821の受託番号で寄託されている。

10 【0026】(3) 異常型プリオンタンパク質特異反応性モノクローナル抗体の反応性の解析

PrPScとの反応性の解析は精製PrPScを固相化したELISA法を用いて行った。ELISAプレートにPrPSc画分を吸着後、種々の終濃度(0, 10, 20, 40, 80, 160又は320 μg/ml)でプロテイナーゼK(PK)処理を行った。PK濃度の上昇に伴い、PrPcおよびPrPSc双方に反応するmAb 31C6、72-5、44B1はPrPSc画分とは反応しなくなるが、mAb 6H10は320 μg/mlのPK消化後でもPrPSc画分と反応した(図1)。これは、mAb 6H10が認識するものはPrPcではないことを示している。なお、この実験で行った、精製PrPScを固相化条件、PK処理条件及びELISAの具体的な方法は次の通りであった。

【0027】1) PrPSc吸着plateの作製

精製PrPSc200ng/50 μl/ウェル(20mM リン酸バッファー中)に分注し4°Cで一晩反応させる。

2) PK処理条件(バッファー・温度・時間等)

PrPSc固相化plateに種々の濃度に希釈したPK(終濃度0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 μg/ml, 50mM Tris/HCl, pH8.0/150 mM NaCl中)を加え、37°C、45分間反応させる。

3) PK反応停止及びプレートのブロッキング

PK処理後、Pefabloc(Roch社)にてPKの活性を阻害(2 mM)し、その後5%-FBS-PBSTでブロッキングを行う(室温・2時間)

4) ブロッキング終了後、PBSTにて3回洗浄し一次抗体(種々のmAb)を加え(50 μl/ウェル)室温にて1時間反応させる。

5) 一次抗体反応終了後PBSTにて3回洗浄し、二次抗体(抗マウスイムノグロブリン家兎抗体: Amersham社製)を加え(50 μl/ウェル)室温にて1時間反応させる。

6) 反応終了後PBSTにて3回洗浄し基質及び発色剤(ABTS)を添加し、室温にて30分反応させる。

7) 酵素反応終了後のplateをプレートリーダーを用い、吸光度測定する。

【0028】(ii) さらに上記と同様にしてPrPScをプレートに吸着後、PK消化(濃度: 40 μg/ml)した後、種々の終濃度(0, 1, 2, 3, 4, 5又は6 M)のグアニジン塩酸塩(GdnHCl)で処理し、上記と同様なELISAにより各モノクローナル抗体との反応性を調べた。mAb 6H10は3 MのGdnHCl濃度で反応が消失し、PrPcおよびPrPSc双

方に反応するmAb 31C6, 72-5はGdnHCl濃度に比例して反応性が強まった。これは、mAb 6H10がPrPScの構造を認識する可能性を示唆している(図2)。

【0029】(iii) 他の方法として、スクレイビー感染マウス脳乳剤を用いたウェスタンブロット(WB)では、mAb 6H10はPrPScとは反応しなかった。PrPScの構造が変化するとmAb 6H10は認識しなくなるという上記結果と一致する。なお、マウス脳乳剤の調製方法及びWBの具体的な条件は次の通りである。脳乳剤の調整(キアゲン社のミキサーミルを使用した場合)

- 1) 200 mgの脳組織をアシスト2 ml丸底チューブに採材する。
- 2) 800 μ lのTN bufferとタングステンビーズを一粒加える。
- 3) ミキサーミルで20Hz, 45sec振盪。
- 4) これを20%(W/W)脳乳剤とし、O-リング付きチューブに保存する。

【0030】WBの具体的な条件

試料調整

- 1) 20%(W/W)脳乳剤250 μ lに界面活性剤バッファ250 μ lを加えVortex および超音波処理を行う。
- 2) 20 μ lの1 mg/ml PKを加え、37°C・30分間消化反応を行う(ウォーターバス中で行う)。
- 3) 10 μ lのPefablock (Roch社製)を加え攪拌(Vortex)し、酵素反応を停止する。
- 4) 250 μ lのブタノール-メタノール溶液を加え攪拌(Vortex)する。
- 5) 15,000 rpm, 10 min, 20°C遠心分離し、沈殿を軽く乾燥させる。
- 6) 100 μ lの1x サンプルバッファを加えて100°C、5分間ボイルする。沈殿が溶けにくい場合は、超音波処理を行う。

【0031】SDS-PAGE

Invitrogen社(旧Novex社)のプレキャストゲルを使用する。

- ・ゲル: NuPAGE 12% Bis-Tris Gel, 1.0 mm, 12ウェル (no. NP0342)
- ・バッファ: 抗酸化剤(No. NP0005)含有 NuPAGE MOPS SDS ランニングバッファ(No. NP0001)
- ・泳動条件はInvitrogen社のInstructionに従う。
- サンプル料は20 μ l (10 mg組織等量)とする。

ウェスタンブロット

- ・ウェットタイプブロッティング装置を使用すること。
- ・バッファ: Invitrogen社のinstructionに指示されたバッファ(NuPAGE トランスファーバッファ(No. NP0006)、抗酸化剤(No. NP0005)、メタノール)にSDSを0.01%になるよう加えたもの。
- ・ブロッティング条件は40V定電圧4時間~15時間。

【0032】免疫染色

- 1) ブロッティング終了後のメンブレンを筒型の容器に

移し、ブロッキング(5%スキムミルク加PBST)を加え、メンブレンローラー上で筒型容器を回転させながら室温・1時間反応を行う。

- 2) ブロッキング終了後、一次抗体液(8103抗PrP抗体等: 0.1~10 μ g/ml; 1%スキムミルク加PBST) 10mlを加え、メンブレンローラー上で室温・1時間反応を行う。
- 3) PBSTで20分間洗浄する。途中5回PBSTの交換を行う。
- 4) 二次抗体液(Amersham NA9340: 1%スキムミルク加PBSTで1:2500希釈)10mlを加え、メンブレンローラー上で室温・45分間反応を行う。
- 5) PBSTで20分間洗浄する。途中5回PBSTの交換を行う。
- 6) メンブレンを容器よりステンレス製バットに取り出し、ECL(Amersham)を添加し、発光反応を行う。
- 7) X-ray filmに2分間露光し、現像を行う。
- 8) 現像している間に、次のX-ray filmを露光させる。
- 9) 30分後に現像(つまり、2分、および30分露光のx-ray filmを作製する)する。

【0033】使用試薬

TNバッファ: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)
 界面活性剤バッファ: 4% Zwittergent3-14, 1% ザルコシル, 100 mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7.5)
 ブタノール-メタノール溶液: 2-ブタノール:メタノール= 5:1
 プロテイナーゼK: 1 mg/ml in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM CaCl₂, 分注、-20°Cで貯蔵。
 Pefablock: 蒸留脱イオン水(DDW)中0.1 M, 分注、-20°Cで貯蔵

【0034】(iv) さらに、PK消化した部分精製PrPSc画分を抗原とし、抗PrP抗体とプロテイン G結合免疫磁性ビーズを用いて免疫沈降を行った。ppt(沈殿)とsup(上清)に含まれるPrPScは、WB後にバイオチン化B-103抗PrP抗体(Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N., and Shinagawa, M., J. Gen. Virol. 76: 2583-2587, 1995.)により検出した。mAb 6H10ではPrPScが免疫沈降されているのに対し、mAb 31C6と抗KLHモノクローナル抗体(α KLH:陰性対照となるmAb)ではPrPScはsupに残存していた。この結果は、mAb 6H10が脳中に存在するPrPSc凝集体に反応することを示している。なお、この実験は、具体的には次のようにして行った。

【0035】1) プロテインG結合磁性ビーズ100 μ l (Dyna1社製)にブロッキング液(5%スキムミルクおよび50%シーブロック(Sea block, Pierce社製)加PBST)を1ml加え室温にて1時間反応させる。

2) ブロッキングが終了したプロテインG結合ビーズに精製PrPSc画分2 μ gと抗体10 μ gの混和液 1ml(1% Triton X-100 (商品名)加PBST)を加え37°C45分間反応させる。

3) 1%Triton X-100加PBSTで4回洗浄し、100 μ lのSDS-PAGE サンプルバッファを加え溶出を行う。

5) 溶出したSDS-PAGE サンプルバッファを用い上記記載の方法にてWB解析を行う。

【0036】(4) 6H10を用いた免疫測定法

抗異常型プリオン特異反応性モノクローナル抗体6H10を用いた免疫測定法の例として凝集法を以下に述べる。

(i) mAb6H10とプロテイン G結合磁性ビーズを混合し37 $^{\circ}$ Cで30分反応させる(抗体結合磁性ビーズの作製)。

(ii) プリオン病感染および非感染マウス脳を所定の方法(上記(3)(iv)に記載)にて処理し、10~20%乳剤を作製する。

(iii) 上記(ii)乳剤を遠心分離した上清と上記(iii)にて作製した抗体結合ビーズを混合し37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させる。

(iv) 上記(iii)の反応後磁石にて抗体結合磁性ビーズ分離し、再度PBSに分散浮遊し、その凝集を観察する。試料中にPrP^{Sc}抗原が存在すると、磁性ビーズが凝集し沈降する。一方、PrP^{Sc}が存在しない場合には、磁性ビーズは凝集せず浮遊したままである。

【0037】この方法により、2種類の異常型プリオン産生マウス脳細胞株(OBIHIRO株(Shinagawa M, Matsuda A, Sato G, Takeuchi M, Ichijo S, Ono T., Nippon Juigaku Zasshi. 1984 Dec;46(6):913-6.)及びI3/I5株(Race RE, Fadness LH, Chesebro B., J Gen Virol. 1987 May;68 (Pt 5):1391-9.)に感染したマウス脳及び *

* 正常マウス脳を試料として免疫測定を行った。その結果、2種の樹立株感染マウス脳は凝集を示し、正常マウス脳は凝集を示さなかった。

【0038】(5) 結論

以上の結果、異常型プリオンタンパク質を対応抗原とし、正常型プリオンタンパク質とは実質的に反応せず、これらの識別を可能とするモノクローナル抗体が得られた。

【0039】

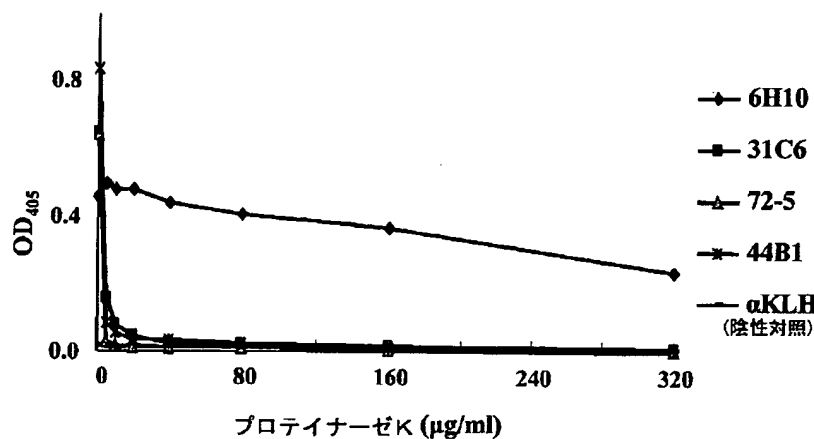
【発明の効果】本発明により、異常型プリオンタンパク質を対応抗原とし、正常型プリオンタンパク質とは実質的に反応しない抗異常型プリオンモノクローナル抗体が初めて提供された。本発明のモノクローナル抗体は、天然の異常型プリオンタンパク質を対応抗原としているので、異常型プリオンタンパク質の測定を高感度に行うことができる。従って、本発明は、プリオン病の診断に大いに貢献するものと考えられる。

【図面の簡単な説明】

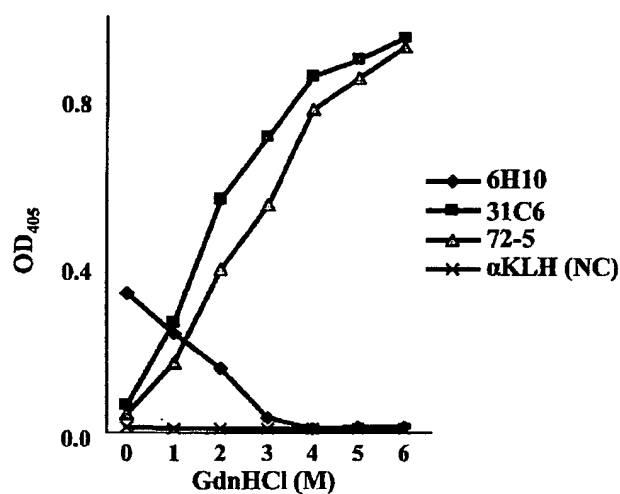
【図1】異常型プリオンタンパク質を、種々の濃度のプロテイナーゼKで処理したものと、各種モノクローナル抗体との反応性をELISAにより調べた結果を示す図である。

【図2】異常型プリオンタンパク質をプロテイナーゼK処理後、種々の濃度のグアニジン塩酸塩で処理したものと、各種モノクローナル抗体との反応性をELISAにより調べた結果を示す図である。

【図1】



【図2】



【手続補正書】

【書類名】	受託番号変更届	*【旧受託番号】	FERM P-18821
【提出日】	平成15年1月27日	【新寄託機関の名称】	独立行政法人産業技術総合研
【旧寄託機関の名称】	独立行政法人産業技術総合研	究所 特許生物寄託セン	
究所 特許生物寄託セン		ター	
ター		*【新受託番号】	FERM BP-8226

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷
G 0 1 N 33/577

識別記号

F I
C 1 2 N 15/00

テーマコード (参考)

C

(72)発明者 梅谷 淳
東京都中央区日本橋浜町2丁目62番5号
富士レビオ株式会社内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA41 DA02 GA05
HA15
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
DA13
4B065 AA93X AA93Y AB05 BD12
CA25 CA46
4H045 AA11 AA20 AA30 CA45 DA76
EA50 FA72